



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Patentschrift**  
⑩ **DE 100 22 751 C 2**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 P 19/04**  
// (C12P 19/04,C12R  
1:02)

⑳ Aktenzeichen: 100 22 751.1-42  
㉔ Anmeldetag: 8. 5. 2000  
㉕ Offenlegungstag: 27. 9. 2001  
㉖ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 18. 4. 2002

**DE 100 22 751 C 2**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑥⑥ Innere Priorität:  
100 13 235. 9 10. 03. 2000

⑦③ Patentinhaber:  
fzmb Forschungszentrum für Medizintechnik und  
Biotechnologie e.V., 99947 Bad Langensalza, DE

⑦④ Vertreter:  
R.-G. Pfeiffer und Kollegen, 07745 Jena

⑦② Erfinder:  
Frankenfeld, Katrin, 99947 Bad Langensalza, DE;  
Hornung, Michael, 99974 Mühlhausen, DE; Lindner,  
Bettina, Dr.-Ing., 99837 Berka, DE; Ludwig, Maria,  
Dr.-Ing., 99610 Sömmerda, DE; Mülverstedt, Anke,  
99976 Eigenrode, DE; Schmauder, Hans-Peter, Prof.  
Dr., 07745 Jena, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

DD	92 136 A
GB	21 31 701 A
US	58 71 978 A
US	48 63 565
US	45 88 400
EP	08 34 555 A1
EP	03 47 481 A1
EP	02 28 779 A2
EP	01 86 495 A2

Biosis Abstract PREV 199800313145;  
Biosis Abstract PREV 199800004733;

⑤④ Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose

⑤⑦ Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose bei dem *Acetobacter xylinum* DSM 13368 mit oder ohne Vorbehandlung mit Cellulase in einem gepufferten, Mineralsalze enthaltendem Medium, das zumindest eine assimilierbare Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 15–30 g/l Medium und zumindest eine assimilierbare Stickstoffquelle in einer Konzentration von 4–6 g/l Medium enthält, bei einem pH-Wert von 4,0–7,2 sowie einer Temperatur von 15–38°C bis zur Bildung einer homogenen Celluloseschicht einer Dicke von maximal 60 mm kultiviert wird, die gebildete Celluloseschicht im Anschluß daran abgetrennt und durch mindestens einmaliges Waschen mit Wasser und/oder einem in der Medizin zugelassenen, leicht alkalischen Reinigungsmittel gereinigt wird und diese gereinigte Celluloseschicht anschließend in Schichten geschnitten oder zu Formkörpern geformt wird, diese wiederum gewaschen werden und diese anschließend mit einem chemischen Stabilisator und/oder einem Wirkstoff versetzt werden.

**DE 100 22 751 C 2**

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose.

[0002] Verfahren zur Herstellung von hydratisierter Cellulose mit Hilfe von Bakterien sind verschiedentlich beschrieben worden. Im allgemeinen werden Bakterien der Species *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* oder *Alcaligenes* zur Herstellung eingesetzt (DE 40 27 479; EP 0 347 481; WO 89/12107). Die Mehrzahl der Verfahren setzt allerdings vor allem *Acetobacter xylinum*, Verwandte von diesem, dessen Varianten und/oder Mutanten zur Herstellung ein (DE 40 27 479; US 4,588,400; US 4,788,146; US 5,228,900; US 5,955,326; EP 0 346 507; EP 0 347 481; EP 0 396 344; WO 89/08148; WO 89/12107; WO 98/30594). Es werden in den jeweiligen Schriften spezielle Stämme als Hauptlieferanten geschützt. Die Herstellung erfolgt sowohl in emerser Kultur durch Bildung einer Schicht von Bakteriencellulose an der Oberfläche der Kulturfüssigkeit (DE 40 27 479; US 4,588,400; US 4,788,146; EP 0 346 507; EP 0 347 481) als auch in bewegter, teilweise auch in kontinuierlicher Kultur in Kolben beziehungsweise Bioreaktoren (US 5,228,900; WO 91/16445), an Membranoberflächen (JP 07274987 A; EP 0 396 344) oder an rotierenden Scheiben (US 5,955,326; WO 97/05271). Aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfs für die Bildung des Biopolymers sind sowohl die emerse Kultivierung als auch die Bioreaktorkultur favorisiert. Sollen zusammenhängende Schichten hergestellt werden, erweist sich die emerse Oberflächenkultur als günstiger.

[0003] Die verwendeten Medien enthalten in der Regel assimilierbare Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Fructose, Mannitol, Sorbitol, Glucose, Cellobiose, seltener wegen des langsameren Wachstums bei der Verwendung Glycerol, Galactose, Lactose, Saccharose, Maltose, Polyalkohole, Polysaccharide, assimilierbare Stickstoffquellen, wie beispielsweise verwertbare Proteine, verwertbare Mineralsalze als Makro- und Mikronährstoffquellen. Der pH-Wert wird für den Bereich von 4,5 bis 6,5 beschrieben und die Temperatur im Bereich von 15 bis 35°C (DE 40 27 479; US 4,588,400; US 4,788,146; US 5,228,900; EP 0 396 344; EP 0 346 507; WO 89/12107). Das Patent DE 40 27 479 sei beispielsweise erwähnt mit dem Hinweis, daß hohe Zelldichten notwendig sind, um gute Ausbeuten bei hohen Qualitätsstandards zu erzielen. Teilweise werden andere Polymere beziehungsweise Cellulosederivate als Hilfsmittel zugesetzt, um die Ausbeute zu steigern und dadurch auch Träger für das gebildete bakterielle Biopolymer zu haben (EP 0 396 344; EP 0 346 507; WO 89/12107). Andere Beeinflussungen erfolgen durch das Wachsen an semipermeablen Membranen zur Ausbildung spezieller Formen beziehungsweise durch die Verwendung von Korkbohrern (EP 0 396 344).

[0004] Trotz großer Bemühungen treten bei der Gewinnung des Biopolymers Inhomogenitäten in der Qualität und Schichtdicke auf (US 5,955,326). Im Patent DE 40 27 479 wird die mechanische Entfernung der ersten Schichtteile zur Erlangung besserer Homogenitäten beschrieben.

[0005] Ein problematischer Technologiebereich ist die Aufbereitung und das Waschen der gebildeten Bakteriencellulose. In der überwiegenden Zahl der Beschreibungen erfolgt das Waschen mit NaOH verschiedener Konzentrationen bei höheren Temperaturen, gefolgt von einer Neutralisierung mit HCl oder Essigsäure (DE 40 27 479; US 4,588,400; US 4,788,146; US 5,228,900; US 5,955,326; EP 0 396 344; WO 89/08148). Andere Reinigungsschritte nutzen Trichloressigsäure (US 4,588,400; US 4,788,146),

Oxidationsmittel, wie bspw. alkalisches Wasserstoffperoxid, NaOCl und/oder ClO<sub>2</sub> (WO 89/08148; WO 91/16445). Auskochen mit Wasser und Essigsäure (WO 98/30594) bzw. eine Behandlung mit nichtwässrigen hydrophilen Lösungsmitteln, Alkylalkoholen oder Ketonen mit weniger als 6 Kohlenstoffatomen (EP 0 346 507) werden auch beschrieben. Gefriertrocknung (WO 89/12107) und/oder Autoklavierung beziehungsweise Behandlungen mit Gamma-Strahlen (US 4,588,400) zur Sterilisation sind weiterhin Bestandteile der beschriebenen Prozesse.

[0006] Je nach Verfahren zur Kultivierung der Organismen sind suspendierbare Bakteriencellulose in den gerührten Kulturen oder mehr oder weniger starke Schichten in den emersen Kulturen erhältlich. Die Schichtstärke muß genau kontrolliert werden, um homogene Qualitäten zu erhalten. Beschrieben sind derartige Schichtbildungen bspw. in den Schriften DE 40 27 479 mit erreichbaren Dicken von > 3 mm, US 4,588,400 mit Dicken zwischen 0,1 und 15 mm oder WO 89/12107, in der die Herstellung von Filmen von 0,1 µm Dicke dargelegt ist. In der Anmeldung WO 98/30594 wird die Umwandlung der gelatinösen Form der Bakteriencellulose in Faserform dargestellt, ein sehr aufwendiges und unökonomisches Unterfangen. Imprägnierungsschritte sind seltener dokumentiert. So ist bspw. die Imprägnierung mit PEG, Glycerol, PVP etc. dokumentiert (US 4,588,400).

[0007] Zu den in den diskutierten Patenten beziehungsweise Patentanmeldungen genannten Hauptapplikationsfeldern der Bakteriencellulose zählen unter anderem die Herstellung von Membranen und Anwendungen in der Papier- und Lebensmittelindustrie (DE 40 27 479), der Einsatz als Verbandsmaterial (US 4,588,400; US 4,788,146), Verwendung als künstliche Blutgefäße (EP 0 396 344), Einsatz in den Gebieten Papierherstellung, Oberflächenbeschichtung, Kunststoffe, Farben (Verdicker), Seifen, Kosmetika, Saugut, Beton, Keramik (WO 89/08148) beziehungsweise als Zusatzstoff für Papier, mit Zusätzen von magnetischem Material, von elektrischem Material, als Zusatzstoffe für Futtermittel und/oder Lebensmittel (WO 89/12107).

[0008] Alle vorgenannten Lösungsvarianten besitzen eine Vielzahl von Nachteilen, die großen Homogenitätsschwankungen, die teilweise aufwendigen Kultivierungstechniken einschließlich der teilweise notwendigen Umwandlungen gelatinöser Produkte in Fasern, die Reinigungsverfahren, bei denen durch den Einsatz sehr radikaler Mittel (NaOH, HCl, Essigsäure, Trichloressigsäure, Oxidationsmittel) und höherer Temperaturen das Risiko einer teilweise partiellen chemischen Veränderung des Polysaccharides eintreten kann. Derartig veränderte Strukturen können den Einsatz im Bereich von Medizin, Veterinärmedizin und/oder Kosmetik deutlich einschränken und sogar verhindern. Der Zusatz von Wirkstoffen ist bislang kaum realisiert worden. Vorrangig wurden dabei Glycerol, PEG und PVA eingesetzt. Weitere erfolgreiche Zusätze von Wirkstoffen oder Austausch des Lösungsmittels Wasser gegen andere Agenzien sind bislang nicht zufriedenstellend gelöst.

[0009] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und ein Verfahren für die Herstellung einer homogenen, sauberen und bedarfsweise mit Wirkstoffen versetzbaren Bakteriencellulose anzugeben, das ökonomisch günstig und variabel durchführbar ist.

[0010] Diese Aufgabe wird mit dem Verfahren nach Patentanspruch 1 gelöst.

[0011] Überraschenderweise war die Kombination von Einzeltechnologien erfolgreich, so daß bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der Einsatz aggressiver Chemikalien zur Reinigung des Produktes entfallen kann, jederzeit ein Aus-

tausch des Wassers oder eine Ergänzung des Wassers in den Schichten mit biologisch aktiven Wirkstoffen erfolgen und gleichzeitig eine Stabilisierung der Bakteriencellulose ohne aufwendiges Autoklavieren, Behandlung mit Gamma-Strahlen oder andere Mittel erfolgen kann. Mittels eines Kultivierungsschrittes im erfindungsgemäßen Verfahren ist eine Herstellung großer Mengen von Bakteriencellulose möglich und durch einen Trennvorgang im Verfahren wird die Fertigung vorgegebener Formen und Schichtdicken ermöglicht. Das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Material besteht aus reiner Cellulose mit der Eigenschaft einer hohen Quellfähigkeit und einem ausgeprägten Vermögen zur Zurückhaltung von Wasser und/oder anderen Flüssigkeiten. Die nach dem Verfahren hergestellten Schichten oder Formteile besitzen eine spezifische, einheitliche Dicke, sind bioverträglich sowie günstig herstell- und weiterverarbeitbar. Aufgrund der natürlichen Herstellung des Polysaccharides ist das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnene Produkt gut biologisch abbaubar und somit gut und umweltverträglich entsorgbar.

[0012] Nachfolgend soll die Erfindung im Detail erläutert werden.

[0013] Zur Herstellung von Bakteriencellulose wird die selektierte Variante *Acetobacter xylinum* DSM 13368 eingesetzt. Das Bakterium *Acetobacter xylinum* DSM 13368 wird in einem Medium kultiviert, das als Kohlenstoffquelle bspw. Glucose, Fructose, Saccharose und/oder Glycerol, als Stickstoffquelle bspw. Proteine, Mineralsalze und ggf. Vitamine enthält. Ein mögliches Medium ist das Schramm-Hestrin-Medium, das in Beispiel 1 näher erläutert ist. Der pH-Wert liegt üblicherweise zwischen pH 4,0 und 7,2, vorzugsweise zwischen 5,8 und 7,0. Die Kultivierung ist möglich im Temperaturbereich 15–38°C, vorzugsweise 25–30°C. Zum Beispiel zur Herstellung von Schichten für Pads zur Anwendung in der Medizin, Veterinärmedizin und/oder Kosmetik hat sich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren die emerse Oberflächenkultur bewährt. Diese kann in Kultivierungssystemen verschiedenster Formen stattfinden. Die Herstellung von Bakteriencellulose nach dem erfindungsgemäßen Verfahren schließt aber auch bewegte Kulturen und die Nutzung rotierender Systeme nicht aus, wenn die Bedingungen zur Erzielung absolut homogener Schichtsysteme beachtet werden. Die einzusetzenden Bakterien können in der Vorkultur mit handelsüblichen Cellulasen vorbehandelt werden. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß der eingesetzte Stamm *Acetobacter xylinum* DSM 13368 unabhängig von der Impfdichte konstante Produktivitäten aufweist. Die Bakteriendichte im Impfmateri- al, bestimmt bei 578 nm, kann zwischen den Werten OD = 0,04–1,2 liegen, ohne daß stärkere Schwankungen in Kultivierungszeit und Ausbeute bemerkbar sind. Die Kultivierung in den emersen Systemen kann über mehrere Wochen erfolgen, ohne daß Nährmedium nachdosiert werden muß. Durch die Langzeitkultivierung kann die Bildung sehr homogener Schichten garantiert werden, ohne daß arbeits- und zeitaufwendige Kontrolloperationen notwendig werden.

[0014] Die Reinigung der gebildeten Schichten von Bakteriencellulose ist überraschenderweise sehr viel einfacher möglich als es bei den oben zitierten Patenten beschrieben wird. Die bis zu 60 mm dicken Schichten werden geteilt und sind nachfolgend im Gegensatz zum Stand der Technik in überraschender Weise mit für andere Verwendungszwecke üblichen mildalkalischen Reinigern, die auch für medizinische Bereiche zugelassen sind, waschbar. Bei maximal 95°C werden die Bakterienreste, Proteine und andere Verunreinigungen bereits bei Behandlungen von 2 · 60 Minuten abgetrennt. Nach der gewünschten Formgebung durch Trennen in Schichten mit homogenen Schichtdicken folgen Wasch-

prozesse mit einem in der Medizin zugelassenen mildalkalischen Reinigungsmittel und mit Wasser, bevor das Stanzen der gewünschten Form auf an sich bekannte Weise erfolgt, wobei die Dicken/die Flächen bei Pads oder Vorstufen von Pads bspw. im Bereich einer maximalen Paddicke von 5 mm und im Bereich einer maximalen Padgröße von 350 · 250 mm sowie die optimale Paddicke in einem Bereich von 1 mm und die optimalen Padgrößen in einem Bereich von 100–140 · 70–90 mm liegen.

[0015] Die Kultivierung kann sowohl emers in Standkultur als auch in bewegter Kultur erfolgen, wobei das Medium bei der Kultivierung als assimilierbare Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose, Saccharose und/oder Glycerol, vorzugsweise Glucose, in Konzentrationen von 15–30 g/l Medium, vorzugsweise 20–25 g/l enthält.

[0016] Neben den assimilierbaren Kohlenstoffquellen enthält das Medium als assimilierbare Stickstoffquelle Proteine, vorzugsweise Peptone, in Konzentrationen von 4–6 g/l Medium, wobei besonders vorteilhaft 4,5–5,5 g/l Verwendung finden.

[0017] Dinatriumhydrogenphosphat · 12H<sub>2</sub>O und Citronensäure werden dem Medium als weitere Inhaltsstoffe zugesetzt, wobei die Konzentration des Phosphates in einem Bereich von 2–10 g/l und die Konzentration der Citronensäure in einem Bereich von 0,5–1,5 g/l liegt.

[0018] Besonders vorteilhaft für das Verfahren liegt die Konzentration des Phosphates in einem Bereich von 6–7 g/l und die der Citronensäure in einem Bereich von 1,0–1,2 g/l.

[0019] Der pH-Wert der Kultivierung liegt im Bereich von pH 4,0 und 7,2, vorzugsweise 5,8–7,0, und die Temperatur wird im Bereich von 15 bis 38°C, vorzugsweise 25–30°C, gehalten.

[0020] Besonders vorteilhaft erfolgt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Vorbehandlung des Impfmateri- als mit Cellulase einer Aktivität von 1–800 NCU, vorzugsweise 150–500 NCU.

[0021] Das mit Cellulasen vorbehandelte bzw. nicht vorbehandelte Inokulum wird auf eine optische Dichte zwischen 0,04–1,2 bei 578 nm eingestellt. Während der emersen Kultivierung, deren Kulturdauer 5–7 Wochen und länger beträgt, erfolgt keine Zudosierung von weiterem Nährmedium, was dazu führt, daß das Kontaminationsrisiko der Kulturen gering gehalten wird.

[0022] Nach der Abtrennung der gebildeten, homogenen Bakteriencelluloseschicht, deren Dicke bis zu 60 mm beträgt, wird diese mit Wasser abgespült, in Schichten mit homogenen Schichtdicken auf an sich bekannte Weise zerteilt und nachfolgend mit einem in der Medizin zugelassenen mildalkalischen Reinigungsmittel und wieder mit Wasser gewaschen.

[0023] Aus dieser so gereinigten Bakteriencellulose- schicht werden für Pads Schichten der Größe von maximal 350 · 250 mm und einer Dicke von maximal 5 mm hergestellt. Besonders vorteilhaft geschieht dies durch mechanisches Schneiden, wobei die optimale Schichtgröße im Bereich von 100 bis 140 · 70 bis 90 mm und die optimale Schichtdicke etwa 1 mm festlegbar ist.

[0024] Für die Verwendung derartiger Schichten und Pads wird die Bakteriencellulose je nach Bedarf in der natürlichen feuchten Form belassen bzw. durch den Zusatz von benötigten Wirkstoffen oder durch vollständigen bzw. teilweisen Austausch der Feuchtigkeit gegen spezielle Lösungen dieser Wirkstoffe modifiziert.

[0025] Als Wirkstoffe sind dabei Lipide, Antioxidantien, wie z. B. Ascorbinsäure oder deren Derivate, Vitamine, wie z. B. Vitamin E, Vitamin D, andere Tocopherole, Bisabolol, Wachstumsfaktoren, z. B. für medizinische Applikationen, Pflanzenextrakte, wie z. B. Aloe vera, Rosmarinsäure, Ar-

nica, Tannine, etherische Öle, einsetzbar.

[0026] Die Schichten und Pads aus Bakteriencellulose können bei Bedarf sterilisiert und mit stabilisierenden Stoffen, wie bspw. dem sekundären Alkohol 1,2-Pentandiol, der in einer Konzentration von 3–15% (w/v) Verwendung findet, versetzt werden.

[0027] Die Hauptanwendungsgebiete dieser, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Produkte aus Bakteriencellulose liegen bspw. in der Medizin, Veterinärmedizin und/oder Kosmetik. Jedoch sind aufgrund der besonderen Eigenschaften der Bakteriencellulose auch andere Applikationsfelder denkbar.

[0028] Besonders die Fähigkeit von Pads aus Bakteriencellulose, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden, Flüssigkeiten je nach Bedarf zu speichern, ist von großer Bedeutung. Bei einer medizinischen Anwendung werden Wunden vor weiterer Verschmutzung geschützt, ein Austrocknen wird verhindert und biologisch aktive bzw. heilende Substanzen können nachgeliefert werden. Für kosmetische Anwendungen ist es darüberhinaus weiterhin möglich, der Haut pflegende Substanzen zuzuführen.

[0029] Anhand der nachfolgenden Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert.

[0030] In einem ersten Beispiel wird die Herstellung homogener Bakteriencelluloseschichten beschrieben.

[0031] In Vorkulturen von *Acetobacter xylinum* (DSM 13368), die im Schramm-Hestrin-Medium kultiviert sind, werden in jeweils 200 ml 0,25 ml einer Cellulase-Lösung mit einer Enzymaktivität im Bereich von 450 NCU gegeben und diese Kulturen bei 30°C inkubiert. Nach Erreichen einer günstigen Bakteriendichte werden Glasgefäße der Abmessung 300 · 200 · 130 mm mit dem Nährmedium nach Hestrin, S. und Schramm, M. [Biochem. J. 58, (1954), 345–352] der folgenden Zusammensetzung befüllt und mit den wie vorstehend beschrieben gewonnenen Vorkulturen von *Acetobacter xylinum* (DSM 13368) beimpft. Das Schramm-Hestrin-Medium hat folgende Zusammensetzung:

Glucose	20 g
Peptone	5 g
Hefeextrakt	5 g
Dinatriumhydrogen- Phosphat · 12H <sub>2</sub> O	2,7 g
Citronensäure	1,15 g
(Destilliertes) Wasser	1 l
pH	6,0

[0032] Das unbehandelte Impfmateriale bildete folgende Schichtdicken aus:

nach 1 Woche	8–10 mm
nach 2 Wochen	20 mm
nach 3 Wochen	30 mm
nach 4 Wochen	35 mm
nach 6 Wochen	40 mm

[0033] Die gebildeten Schichten aus Bakteriencellulose werden den Gefäßen entnommen, kurzzeitig mit Wasser abgespült, in Schichten mit einer homogenen Dicke von 1 bis 1,5 mm zerteilt, mit einem in der Medizin zugelassenen, leicht alkalischen Waschmittel in einer Maschine gewaschen, gut mit Wasser gespült, autoklaviert und zum Stabilisieren mit 5% (w/v) 1,2-Pentandiol imprägniert. Die so hergestellten Schichten können sofort oder nach Weiterverar-

beitung einer Anwendung in der Medizin, Veterinärmedizin und/oder Kosmetik zugeführt werden.

[0034] In einem zweiten Beispiel wird die Herstellung von Pads aus Bakteriencellulose zur Anwendung in der Kosmetik beschrieben.

[0035] Aus Bakteriencelluloseschichten, hergestellt nach dem Verfahren analog Beispiel 1, werden Pads hergestellt. Derartige Pads besitzen gute Applikationseigenschaften für Masken und können herkömmliche Masken aus Kollagen, Alginaten und/oder Hyaluronsäure ersetzen. Durch die Stabilisierung mit 1,2-Pentandiol, einem in der Kosmetik zugelassenen stabilisierenden sekundären Alkohol, sind die Gebrauchseigenschaften deutlich erhöht. Auch ist es möglich, das Wasser ganz oder teilweise gegen Lösungen von Wirkstoffen auszutauschen und/oder die feuchten Bakteriencelluloseschichten mit derartigen Stoffen und/oder Mischungen zu imprägnieren. Als Wirkkomponenten sind beispielsweise Antioxidantien, z. B. Ascorbinsäure oder deren Derivate, Vitamine, wie z. B. Vitamin E, Vitamin D, andere Tocopherole, Bisabolol, Wachstumsfaktoren, z. B. für medizinische Applikationen, Pflanzenextrakte, wie z. B. Aloe vera, Rosmarinsäure, Arnica, Tannine, etherische Öle, einsetzbar.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose bei dem *Acetobacter xylinum* DSM 13368 mit oder ohne Vorbehandlung mit Cellulase in einem gepufferten, Mineralsalze enthaltendem Medium, das zumindest eine assimilierbare Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 15–30 g/l Medium und zumindest eine assimilierbare Stickstoffquelle in einer Konzentration von 4–6 g/l Medium enthält, bei einem pH-Wert von 4,0–7,2 sowie einer Temperatur von 15–38°C bis zur Bildung einer homogenen Celluloseschicht einer Dicke von maximal 60 mm kultiviert wird, die gebildete Celluloseschicht im Anschluß daran abgetrennt und durch mindestens einmaliges Waschen mit Wasser und/oder einem in der Medizin zugelassenen, leicht alkalischen Reinigungsmittel gereinigt wird und diese gereinigte Celluloseschicht anschließend in Schichten geschnitten oder zu Formkörpern geformt wird, diese wiederum gewaschen werden und diese anschließend mit einem chemischen Stabilisator und/oder einem Wirkstoff versetzt werden.

2. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in Emerskultur durchgeführt wird.

3. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in bewegter Kultur durchgeführt wird.

4. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als assimilierbare Kohlenstoffquelle Glucose, Fructose, Saccharose und/oder Glycerol eingesetzt wird.

5. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als assimilierbare Stickstoffquelle ein Proteinlysate eingesetzt wird.

6. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach den Ansprüchen 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß als assimilierbare Stickstoffquelle Pepton eingesetzt

wird.

7. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium durch Citronensäure und Dinatriumhydrogenphosphat 5 gepuffert wird.

8. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach den Ansprüchen 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß dem Medium Citronensäure in einer Konzentration von 10 1,0–1,5 g/l Medium und Dinatriumhydrogenphosphat in einer Konzentration von 0,5–2,0 g/l Medium zugegeben wird.

9. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach 15 Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Celluloseschicht in einzelne, 0,1 bis 5 mm dicke Schichten geschnitten wird.

10. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach 20 Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Celluloseschicht in einzelne Formkörper einer Flächen von 100–500 000 mm<sup>2</sup> und einer Dicke von 0,1 bis 5 mm durch Stanzen zerteilt wird.

11. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach 25 Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als chemischer Stabilisator 1,2 Pentandiol eingesetzt wird.

12. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach 30 Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Antioxidantien verwendet werden.

13. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach 35 Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Vitamine eingesetzt werden.

14. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach 40 Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Wachstumsfaktoren eingesetzt werden.

15. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach 45 Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Pflanzenextrakte eingesetzt werden.

16. Verfahren zur Herstellung von spezifischen Formkörpern oder Schichten aus Bakteriencellulose nach 50 Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Lipide eingesetzt werden.

50

55

60

65

- Leerseite -

The invention concerns a procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose.

Procedures for the production of hydratisierter cellulose by bacteria were described occasionally. Generally bacteria of the Species *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* or *Alcaligenes* are used for production (DE 40 27 479; EP 0,347,481; WHERE 89/12107). The majority of the procedures sets however above all *Acetobacter xylinum*, used from this, its variants and/or Mutanten to the production (DE 40 27 479, US 4,588,400; US 4,788,146; US 5,228,900; US 5,955,326; EP 0,346,507; EP 0,347,481; EP 0,396,344; WHERE 89/08148; WHERE 89/12107; WHERE 98/30594). In the respective writings special trunks are protected as main suppliers. The production takes place both in emerser culture via formation of a layer from bacteria cellulose at the surface of the culture liquid (DE 40 27 479; US 4,588,400; US 4,788,146; EP 0,346,507; EP 0,347,481) and in more moved, partly also in continuous culture in pistons and/or bioreactors (US 5,228,900; WHERE 91/16445), at diaphragm surfaces (JP 07274987 A; EP 0,396,344) or at rotary disks (US 5,955,326; WHERE 97/05271). Due to the high Sauerstoffbedarf for the formation of the bio polymer both emerse cultivation and the bioreactor culture are favored. If connected layers are to be manufactured, the emerse surface culture proves as more favorable.

The used media contain usually assimilatable sources of carbon, as for example of Fructose, Mannitol, Sorbitol, glucose, Cellobiose, more rarely because of slower growth with the use Glycerol, Galactose, lactose, Saccharose, Maltose, Polyalkohole, Polysaccharide, assimilatable sources of nitrogen, as for example usable proteins, usable mineral salts than macro and sources of micro nutrient. The pH value is described for the range from 4,5 to 6,5 and the temperature within the range of 15 to 35 DEG C (DE 40 27 479; US 4,588,400; US 4,788,146; US 5,228,900; EP 0,396,344; EP 0,346,507; WHERE 89/12107). The patent DE 40 27 479 is for example mentioned with the reference that high cell densities are necessary, in order to obtain good yields with high quality standards. Other polymers and/or cellulose derivatives than aids are partly added, in order to increase the yield and to have thus also carriers for the formed bacterial bio polymer (EP 0,396,344; EP 0,346,507; WHERE 89/12107). Other influences take place via growing diaphragms semipermerablen on for the training of special forms and/or via the use of cork borers (EP 0,396,344).

Despite large efforts inhomogeneities in the quality and layer thickness step on with the production of the bio polymer (US 5.955.326). In the patent DE 40 27 479 the mechanical distance of the first layer parts is described for the acquisition of better homogeneities.

A problematic field of technology is the dressing and washing the formed bacteria cellulose. In the predominant number of the descriptions washing with NaOH of different concentrations takes place at higher temperatures, followed of a neutralization with HCl or acetic acid (DE 40 27 479; US 4,588,400; US 4,788,146; US 5,228,900; US 5,955,326; EP 0,396,344; WHERE 89/08148). Other cleaning steps use tri chlorine acetic acid (US 4,588,400; US 4.788.146), oxidizing agents, as bspw. alkaline hydrogen peroxide, NaOCl and/or ClO<sub>2</sub> (WHERE 89/08148; WHERE 91/16445). Auskothen with water and acetic acid (WHERE 98/30594) and/or. a treatment with not-aqueous hydrophilic solvents, alkyl alcohols or Ketonen with less than 6 carbon atoms (EP 0,346,507) is also described. Freezing drying process (WHERE 89/12107) and/or Autoklavierung and/or treatments with gamma-rays (US 4.588.400) for sterilization are further components of the described processes.

Depending upon procedures for the cultivation of the organisms suspendable bacteria cellulose in the agitated cultures or more or less strong layers is available in the emersen

cultures. The layer strength must be controlled exactly, in order to receive homogeneous qualities. Such layer formations are described bspw. in the writings DE40 27 479 with attainable thicknesses of > 3 mm, US 4.588.400 with thicknesses between 0,1 and 15 mm or WHERE 89/12107, in which the production of films of 0,1  $\mu$ m thickness is stated. In the registration WHERE 98/30594 the transformation of the gelatinösen form of the bacteria cellulose in fiber form represented, a very complex and uneconomic venture. Impregnation steps documented more rarely. Like that is bspw. the impregnation with PEG, Glycerol, PVP etc. documented (US 4.588.400).

Among the main application fields of the bacteria cellulose specified in the discussed patents and/or patent applications rank among other things the production of diaphragms and applications in the paper and foodstuffs industry (DE 40 27 479), the employment as dressing material (US 4,588,400; US 4.788.146), use as artificial blood vessels (EP 0,396,344), employment in the areas paper trade, surface coating, plastics, colors (thick), soaps, Kosmetika, seeds, concrete, ceramic(s) (WHERE 89/08148) and/or as additive for paper, with additives of magnetic material, of electrical material, as additives for feeds and/or food (WHERE 89/12107).

All aforementioned solution variants possess a multiplicity of disadvantages, which large homogeneity fluctuations, which partial complex cultivation techniques including partial necessary transformations the gelatinöser products in fibers, which cleaning methods, with which by the employment of very radical means (NaOH, HCl, acetic acid, tri chlorine acetic acid, oxidizing agent) and higher temperatures the risk can occur partial partial chemical change of the Polysaccharides. So changed structures can limit and even prevent the employment clearly within the range of medicine, veterinary medicine and/or Kosmetik. The additive of active substances was so far hardly realized. Thereby Glycerol, PEG and PVA were used with priority. Further successful additives of active substances or exchange of the solvent water against other agents are so far not satisfyingly solved.

The task of the available invention is to avoid the disadvantages of the state of the art and a procedure for the production of a homogeneous to indicate clean and bedarfsweise bacteria cellulose shiftable with active substances which is economically favorable and variable feasible.

This task is solved with the procedure after patent claim 1.

Surprisingly the combination of single technologies was successfully, so that with the procedure according to invention the employment of aggressive chemicals can be void for the cleaning of the product, at any time an exchange of the water or an addition of the water in the layers with biologically active active substances to take place and a stabilization of the bacteria cellulose without complex autopianos, treatment with gamma-rays or other means at the same time take place can. By means of a cultivation step in the procedure according to invention production of large quantities of bacteria cellulose and by a separation process is possible in the procedure the manufacturing of given forms and layer thicknesses is made possible. According to invention the material manufactured in the procedure consists of pure cellulose with the characteristic of a high source ability and a pronounced fortune for the restraint of water and/or other liquids. The layers or shaped parts manufactured in the procedure possess a specific, uniform thickness, are biocompatibly as well as favorably manufacture and further-processable. Due to the natural production of the Polysaccharides according to invention the product won in the procedure is well biologically degradable and thus well and environmentalcompatibly entsorgbar.

In the following the invention in the detail is to be described.



For the production of bacteria cellulose the selected variant *Acetobacter xylinum* DSM 13368 is cultivated in a medium, that as source of carbon bspw. Glucose, Fructose, Saccharose and/or Glycerol, as source of nitrogen bspw. Proteins, mineral salts and if necessary. Vitamine contains. A possible medium is the scratch Hestrin medium, which is described in example 1 more near. The pH value lies usually between pH 4.0 and 7.2, preferably between 5,8 and 7,0. Cultivation is possible in the temperature range 15-38 DEG C, preferably 25-30 DEG C. For example to the production of layers for Pads for application in the medicine, veterinary medicine and/or Kosmetik in the procedure according to invention the emerse surface culture worked. This can take place in Kultivationssystemen of most diverse forms. In addition, the production of bacteria cellulose in the procedure according to invention does not exclude moved cultures and the use of rotary systems, if the conditions are considered for the achievement of absolutely homogeneous layer systems. The bacteria which can be used can be pre-treated in the Vorkultur with commercial Cellulasen. Surprisingly it turned out that the assigned trunk *Acetobacter xylinum* DSM 13368 independently of the inoculation density constant Produktivitäten. The bacteria density in the inoculation material, certainly with 578 Nm, can lie between the values  $OD = 0.04-1.2$ , without stronger fluctuations are noticeable in cultivation time and yield. Cultivation in the emersen systems can take place over several weeks, without growth medium must be after-proportioned. The education of very homogeneous layers can be guaranteed by long-term cultivation, without work and time-consuming control operations become necessary.

The cleaning of the formed layers from bacteria cellulose is surprisingly very many more simply possible than it with the patents quoted above is described. The layers thick up to 60 mm are divided and are in the following contrary to the state of the art in surprising way also for other intended purposes usual mild-alkaline cleaners, which are certified for medical ranges also, waschbar. With maximally 95 DEG C the bacteria remainders, proteins and other impurities with treatments from 2,60 minutes are already separated. After the desired shaping by separation into layers with homogeneous layer thicknesses wash process with cleaning agents mild-alkaline in the medicine certified and with water follows, before punching the desired form in actually well-known way takes place, whereby the thicknesses/the surfaces with Pads or preliminary stages of Pads bspw. in the range and in the range of a maximum PAD size of 350,250 mm as well as the optimal PAD thickness in a range from 1 mm and the optimal PAD sizes in a range from 100-140,70-90 mm are appropriate for a maximum PAD thickness of 5 mm.

Cultivation can take place both emers in condition culture and in moved culture, whereby the medium with cultivation as assimilatable sources of carbon glucose, Fructose, Saccharose and/or Glycerol, preferably glucose, contain in concentrations of 15-30 g/l medium, preferably 20-25 g/l.

Beside assimilatable sources of carbon the medium contains Peptone, in concentrations of 4-6 g/l medium, as assimilatable source of nitrogen of proteins, preferably whereby 4.5-5.5 finds g/l use particularly favourably.

Dinatriumhydrogenphosphat.  $12H_2O$  and Citronensäure are added to the medium as further contents materials, whereby the concentration of the phosphate lies in a range from 2-10 g/l and the concentration of the Citronensäure in a range from 0,5-1,5 g/l.

For the procedure the concentration of the phosphate lies particularly favourably in a range from 6-7 g/l and those the Citronensäure within a range from 1,0-1,2 g/l.

The pH value of cultivation is appropriate for 5.8-7.0 within the range of pH 4.0 and 7.2, preferably, and the temperature is held within the range of 15 to 38 DEG C, preferably 25-30 DEG C.

A pretreatment of the inoculation material with Cellulase of an activity takes place particularly favourably from 1-800 NCU, preferably 150-500 NCU with the procedure according to invention.

With Cellulase pre-treated and/or. not pre-treated Inokulum is adjusted to an optical density between 0,04-1,2 with 578 Nm. While the emersen cultivation, whose culture duration amounts to longer 5-7 weeks and, takes place no metering of further growth medium, which leads to the fact that the contamination risk of the cultures is kept small.

After the separation of the formed, homogeneous bacteria cellulose layer, whose thickness up to 60 mm amounts to, this with water one rinses off, one divides in layers with homogeneous layer thicknesses in actually well-known way and one washes in the following with cleaning agents mild-alkaline in the medicine certified and again with water.

Of this in such a way cleaned bacteria cellulose layer for Pads layers of the size of maximally 350,250 mm and a thickness are made by maximally 5 mm. This is done particularly favourably via mechanical cutting, whereby the optimal layer size is about 1 mm definable within the range of 100 to 140,70 to 90 mm and the optimal layer thickness.

For the use the bacteria cellulose will leave of such layers and Pads depending upon need in the natural damp form and/or. by the additive of necessary active substances or by complete and/or. partial exchange of the humidity against special solutions of these active substances modifies.

As active substances thereby Lipide, Antioxidantien, are like z. B. Ascorbic acid or their derivatives, Vitamine, like z. B. Vitamin E, Vitamin D, other Tocopherole, Bisabolol, growth factors, z. B. for medical applications, plant extracts, like z. B. Aloe vera, Rosmarinsäure, Arnica, Tannine, etherische oils, applicable.

The layers and Pads from bacteria cellulose can if necessary sterilized and with stabilizing materials, as bspw. the secondary alcohol 1,2-Pentandiol, which finds use in a concentration of 3-15% (w/v), to be shifted.

The main fields of application of these according to invention products of bacteria cellulose, manufactured in the procedure, lie bspw. in the medicine, veterinary medicine and/or Kosmetik. However also different application fields are conceivable due to the special characteristics of the bacteria cellulose.

Particularly the ability of Pads from bacteria cellulose, which are manufactured in the procedure according to invention, to store liquids depending upon need is of great importance. With a medical application wounds are protected against further contamination, draining is prevented and biologically active and/or. welfare-end substances can be delivered subsequently. For cosmetic applications is it in addition further possible to supply to the skin maintaining substances.

On the basis the following remark examples the invention is more near described.

In a first example the production of homogeneous bacteria cellulose layers is described.

In Vorkulturen of *Acetobacter xylinum* (DSM 13368), which in the scratch Hestrin medium are cultivated, in in each case 200 ml 0.25 ml a Cellulase solution with an enzyme activity within the range of 450 NCU are given and these cultures with 30 DEG C are inkubiert. After reaching a favorable bacteria density glass containers of the dimension become 300.200.130 mm with the growth medium after Hestrin, S. and scratch, M.

[Biochem. J. 58, (1954), 345-352] of the following composition filled and with as managing described won Vorkulturen of *Acetobacter xylinum* (DSM 13368) inoculated. The scratch Hestrin medium has the following composition:

< tb> < TABLE> Columns=2>
< tb> < UCB AL=L> Dinatriumhydrogen-Phosphat.12H2O< SEP> 2.7 g
< tb> Citronensäure< SEP> 1.15 g
< tb> (Distilled) Wasser< SEP> 1 l
< tb> pH< SEP> 6,0
< tb> < /TABLE>

The untreated inoculation material trained the following layer thicknesses:

< tb> < TABLE> Columns=2>
< tb> < UCB AL=R> 30 mm
< tb> after 4 Wochen< SEP> 35 mm
< tb> after 6 Wochen< SEP> 40 mm
< tb> < /TABLE>

The formed layers from bacteria cellulose are inferred from the containers, washed briefly with water rinsed off, in layers with a homogeneous thickness from 1 to 1.5 mm divided, with in the medicine a certified, to easily alkaline detergents in a machine, rinsed, autoklaviert well with water and impregnated for stabilization with 5% (w/v) 1,2-Pentandiol. In such a way manufactured layers can be supplied immediately or after subsequent treatment of an application in the medicine, veterinary medicine and/or Kosmetik.

In a second example the production of Pads from bacteria cellulose is described for application in the Kosmetik.

Made of bacteria cellulose layers, in the procedure similar to example 1, Pads are manufactured. Such Pads possesses good application characteristics for masks and can conventional masks from Kollagen, Alginaten and/or Hyaluronsäure replace. By stabilization with 1,2-Pentandiol, in the Kosmetik certified stabilizing secondary alcohol, the performance characteristics are clearly increased. Also it is possible to exchange the water totally or partly against solutions of active substances and/or to impregnate the damp bacteria cellulose layers with such materials and/or mixtures. As effect components for example Antioxidantien are, z. B. Ascorbic acid or their derivatives, Vitamine, like z. B. Vitamin E, Vitamin D, other Tocopherole, Bisabolol, growth factors, z. B. for medical applications, plant extracts, like z. B. Aloe vera, Rosmarinsäure, Arnica, Tannine, etherische oils, applicable.

1. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose with the *Acetobacter* is cultivated xylinum DSM 13368 with or without pretreatment with Cellulase in a buffered, mineral salts containing medium, which contains at least a assimilatable source of carbon in a concentration of 15-30 g/l medium and at least a assimilatable source of nitrogen in a concentration of 4-6 g/l medium, at a pH value of 4,0-7,2 as well as a temperature of 15-38 DEG C up to the education of a homogeneous cellulose layer of a thickness of maximally 60 mm, the formed cellulose layer is afterwards separated and by at least unique washing with water and/or in the medicine certified, easily alkaline cleaning agents cleaned and this cleaned cellulose layer afterwards in layers is cut or to molded articles formed, this to be again washed and these afterwards with a chemical stabilizer and/or an active substance be shifted.
2. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that the procedure is accomplished in Emerskultur.
3. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that the procedure is accomplished in moved culture.
4. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that as assimilatable source of carbon glucose, Fructose, Saccharose and/or Glycerol are used.
5. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that as assimilatable source of nitrogen a Proteinlysate is used.
6. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to the requirements 1 and 5, by the fact characterized that as assimilatable source of nitrogen Pepton is used.
7. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that the medium is buffered by Citronensäure and DIN atrium hydraulic gene phosphate.
8. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to the requirements 1 and 7, by the fact characterized that Citronensäure in a concentration of 1,0-1,5 is admitted to the medium g/l medium and DIN atrium hydraulic gene phosphate in a concentration of 0,5-2,0 g/l medium.
9. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that the cellulose layer is cut into individual, 0.1 to 5 mm thick layers.
10. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 9, by the fact characterized that the cellulose layer mm< into individual molded articles surfaces of 100-500 000; 2> and a thickness from 0,1 to 5 mm by stamping machines one divides.
11. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that as chemical stabilizer 1.2 Pentandiol one uses.
12. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that as active substance Antioxidantien are used.

13. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that as active substance Vitamine are used.

14. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that as active substance growth factors are used.

15. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that as active substance plant extracts are used.

16. Procedure for the production of specific molded articles or layers from bacteria cellulose according to requirement 1, by the fact characterized that as active substance Lipide are used.